



دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع دکترای تخصصی (Ph. D) رشته بیوشیمی بالینی

عنوان:

اثرات درون تنی و برون تنی تریاک و برخی پلی مورفیسم ها بر میزان بیان ژنهای CD9، CD36 و CD68 در مونوسیت های خون محیطی و برخی شاخصهای اکسیدانی و التهابی در افراد مبتلا به آترواسکلروز معتاد، غیر معتاد به تریاک و افراد سالم

توسط

محمد امین مومنی مقدم

استاد راهنما:

دکتر غلامرضا اسدی کرم

اساتید راهنما

دکتر محمد معصومی | دکتر محمد کاظمی | دکتر علیرضا فارسی نژاد

سال تحصیلی (مهر ۹۸)

شماره پایان نامه: (۵۵۶)

چکیده:

مقدمه و اهداف: بیماری های قلبی و عروقی (CAD) یکی از مهمترین عوامل مرگ و میر می باشند. یکی از عواملی که ممکن است در گسترش CAD نقش داشته باشد تریاک است. مکانیسم مولکولی اثر این ماده در رابطه با این بیماری به طور دقیق مشخص نشده است. هدف از این طرح، بررسی اثر تریاک در رابطه با بیان گیرنده های رفتگر، شامل CD36 و CD68، مولکول تتراسپانین CD9 و برخی از سایتوکاین های پیش برنده و ضد التهابی در افراد مبتلا به آترو اسکروز معتاد به تریاک، غیر معتاد و افراد سالم و همچنین در رده مونوسیتی THP-1 می باشد. همچنین در این مطالعه ارتباط بین پلی مورفیسم rs1761667 ($G > A$) ژن CD36 با فشار خون و CAD ارزیابی شد.

روشها: این مطالعه در سه بخش بالینی، کشت سلول و بررسی پلی مورفیسم انجام شد. بخش اول مطالعه بر روی سه گروه شامل ۱- افراد مبتلا به CAD و معتاد به تریاک (۳۰ نفر) ۲- افراد مبتلا به CAD (۳۰ نفر) و ۳- افراد سالم (۱۷ نفر) انجام شد. میزان بیان ژنها و پروتئین های CD9، CD36 و CD68 به ترتیب با تکنیک RT-PCR و فلوسایتومتری بررسی شد. میزان سطوح پلاسمایی سایتوکاین ها بوسیله تکنیک الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت. در بخش دوم، سلول های رده مونوسیتی THP-1 در محیط کشت کامل کشت داده شده و تیمار سیگار و تریاک به صورت جداگانه و ترکیبی انجام شد و بیان ژنها و پروتئین ها مانند بخش اول، ارزیابی گردید. در بخش سوم، پلی مورفیسم rs1761667 ($G > A$) ژن CD36 در چهار گروه از افراد شامل ۱) فشار خون بالا (۵۲ نفر) ۲) فشار خون بالا و CAD (۵۷ نفر)، ۳) CAD (۶۵ نفر) ۴) بدون فشار خون بالا و CAD به عنوان گروه شاهد (۶۴ نفر)، با استفاده از تکنیک PCR-RFLP بررسی شد.

یافته ها: میزان بیان CD36 در افراد سالم نسبت به افراد CAD معتاد به تریاک ($P < 0.001$) و افراد CAD غیر معتاد ($P = 0.002$) بیشتر بود. میزان سایتوکاین های IL-23، IL-17، IL-10، TNF- α و IFN- γ در افراد آترو اسکروز معتاد به تریاک نسبت به افراد غیر معتاد و گروه کنترل بیشتر بود. سطح IL-1 β در افراد کنترل افزایش بیشتری نسبت به دو گروه دیگر داشت. سیگار، و نه تریاک بیان گیرنده های رفتگر CD36 و CD68 را در سطح

mRNA ($P < 0.001$) و پروتئین (به ترتیب، $P = 0.016$ و $P = 0.012$) نسبت به گروه کنترل افزایش داد، همچنین بیان پروتئین CD9 نیز نسبت به گروه کنترل بیشتر بود ($P = 0.041$).

فروانی ژنوتیپ پلی مورفیسم rs1761667 ژن CD36 در چهار گروه تفاوت معنی داری داشت ($P = 0.003$). مدل ارثی غالب ((GA + AA) در مقابل ((GG)) پلی مورفیسم ژن CD36 (rs1761667) یک اثر محافظتی در بین بیماران مبتلا به فشار خون بالا (گروه ۱) ($OR = 0.170$; 95% CI = 0.061-0.473; $P = 0.001$) و بیماران CAD (گروه ۳) ($OR = 0.218$; 95% CI = 0.085- 0.557; $P = 0.001$) داشت.

بحث و نتیجه گیری:

به طور کلی تریاک باعث القای التهاب از طریق تداخل با داروهای ضد التهابی و مستقل از گیرنده های رفتگر CD36 و CD68 و تتراسپانین CD9 می شود، که منجر به عوارض شدیدی در بیماری CAD میشود. سیگار از طریق افزایش بیان CD36 و CD68 و افزایش پروتئین CD9 در گسترش و پیشرفت بیماری های قلبی عروقی نقش دارد. به عنوان نتیجه از مطالعه پلی مورفیسم rs1761667 ژن CD36، این SNP ممکن است به عنوان یک فاکتور محافظت کننده برای افزایش فشار خون و CAD در جمعیت جنوب شرق ایران باشد.

؛ پلی مورفیسم CD68؛ CD36؛ CD9 کلید واژه: بیماری قلبی-عروقی؛ تریاک؛ سایتوکاین؛

Abstract

Background and Objectives : It is suggested that opium may play a potential role in the development and progression of coronary artery disease (CAD). The molecular mechanism of this substance in relation to CAD has not yet been determined exactly. The aim of the present study was to explore the role of opium on the expression of scavenger receptors, including CD36 and CD68, CD9 tetraspanin, some pro-inflammatory, and anti-inflammatory cytokines in the CAD opium-addicted and non-opium-addicted patients and in THP-1 cell line. Also, the present study was conducted to investigate the possible association of CD36 rs1761667 (G>A) gene polymorphism with hypertension and/or CAD.

Methods: Subjects were divided into three groups: 1) CAD opium-addicted (CAD-addicted, n=30); 2) CAD non-opium-addicted (CAD, n=30); and finally 3) non-opium-addicted with no CAD individuals as a control group (Ctrl, n=17). The protein and mRNA levels of CD9, CD36, and CD68, were evaluated by flow cytometry and Real-Time PCR methods, respectively. Plasma levels of cytokines were evaluated by ELISA technique. In relation to in vitro section, the THP-1 cell line was grown in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS 1% Penicillin-Streptomycin in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37 °C. The cells were treated with cigarette smoke extract and opium in 24 hr incubation. The protein and mRNA levels of CDs were evaluated. For evaluation of CD36 rs1761667 (G>A) gene polymorphism study was composed of 238 subjects who were admitted for coronary angiography, and divided into four groups: 1) hypertensive without CAD (H-Tens, n=52); 2) hypertensive with CAD (CAD+H-Tens, n=57); 3) CAD without hypertension (CAD,

n=65); and 4) non-hypertensive without CAD as the control group (Ctrl, n=64). The CD36 rs1761667 polymorphism was genotyped with PCR-RFLP method.

Results: CD36 increased significantly in mRNA in both CAD and CAD-addicted patients compared to the Ctrl group ($P = 0.013$ and $P = 0.001$ respectively). The plasma levels of IL-23, IL-17, IL-10, TNF- α , and IFN- γ were significantly higher in the CAD-addicted group than the CAD and Ctrl groups. The IL-1 β levels were shown to be significantly higher in the Ctrl group.

CD36 and CD68 mRNA and protein expression levels were significantly increased in the cells treated with cigarette smoke extract compared to the control ($P < 0.001$ in mRNA expression levels and $P = 0.016$ and $P = 0.012$ in protein expression levels, respectively). The CSE increased the level of CD9 protein expression compared to the control group ($P = 0.041$) on the human macrophage cell line THP-1. No significant differences were observed in the CD9, CD36 and CD68 gene expression and at the protein levels between opium-treated THP-1 cells and controls.

The genotype, but not allele frequency of the CD36 rs1761667 was significantly different between the four study groups ($P = 0.003$). Furthermore, recessive inheritance model of CD36 rs1761667 polymorphism was significantly associated with an increased risk of CAD with hypertension (OR = 5.677; 95% CI = 1.053–30.601; $P = 0.043$). However, the dominant model of CD36 rs1761667 had a protective effect on H-Tens and CAD patients.

Conclusion: The results of the present study demonstrated that opium induces inflammation independent of CD36 and CD68 scavenger receptors and CD9, which can lead to deterioration of CAD complications. Cigarette increased the expression of CD36 and CD68 at the gene and protein

levels and CD9 expression at the protein level. Therefore cigarette may play an important role in the pathogenesis and development of many inflammatory diseases, including cardiovascular diseases, COPD and lung carcinoma through up expression of CD36, CD68 and CD9. Furthermore, our results revealed that opium has not shown significant effect on the expression of CD36, CD68 and CD9 at the gene and protein levels at least at the time and dose which design in the present study, hence the role of opium in development of inflammatory diseases such as cardiovascular diseases in human (which reported by some researchers) are mediated by other mechanisms. Also, the present findings revealed an association of CD36 rs1761667 polymorphism with susceptibility to hypertension and/or CAD in the Iranian population.

Keywords: Opium; Coronary artery disease; Cytokines; CD9; CD36; CD68; SNP.



KERMAN UNIVERSITY
OF MEDICAL SCIENCES

Faculty of Medicine

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Ph. D

Title

**Effects of in vivo and ex vivo of opium and some polymorphisms on the expression of
CD9, CD36 and CD68 genes in peripheral blood monocytes and some oxidant and
inflammatory indices in patients with atherosclerosis addicted to opium, non- opium -
addicted and healthy subjects**

By:

Mohammad Amin Momeni-Moghaddam

Supervisor

Gholamreza Asadikaram

Asvisors :

**1-Dr. Mohammad Masoumi | 2-Dr. Mohammad Kazemi Arababadi
| 3-Dr. Alireza Farsinejad**

Thesis No : (556) Date (Sep/2019)



بسمه تعالی

صور تجلسه دفاع از پایان نامه

تاریخ: ۹۸/۷/۴

شماره: ۹۸۳/۵۵۶

کد اخلاق: IR-KMU-REC
۱۳۹۵.۲۹۱

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی آقای محمد امین مؤمنی مقدم دانشجوی دکتری تخصصی (Ph.D) رشته بیوشیمی بالینی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان "اثرات درون تنی و برون تنی ترباک و برخی پلی مورفیسم ها بر میزان بیان ژنهای CD9، CD36 و CD68 در مونوسیت های خون محیطی و برخی شاخصهای اکسیدانی و التهابی در افراد مبتلا به آترواسکلروز معناد، غیر معناد به ترباک و افراد سالم" در ساعت 13 ظهر روز شنبه مورخ 98/7/6 با حضور اعضای محترم هیات داوران به شرح ذیل:

امضا	نام و نام خانوادگی	سمت
	جناب آقای دکتر غلامرضا اسدی کرم	الف: استاد راهنما
	1- جناب آقای دکتر محمد معصومی	ب: استادان مشاور
	2- جناب آقای دکتر محمد کاظمی	
	3- جناب آقای دکتر علیرضا فارسی نژاد	
	جناب آقای دکتر حسین فلاح	ج: عضو هیات داوران (داخلی)
	جناب آقای دکتر عبداله جعفرزاده	ج: عضو هیات داوران (داخلی)
	جناب آقای دکتر مهدی حسن شاهبان	د: عضو هیات داوران (خارجی)
	جناب آقای دکتر حسینعلی ساسان	د: عضو هیات داوران (خارجی)
	جناب آقای دکتر حسین پور	ه: نماینده تحصیلات تکمیلی

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه عالی و نمره ۲۰/۱۰ مورد تأیید قرار گرفت.

مهر و امضاء معاون آموزشی